

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑪ 公開特許公報(A)

昭63-22526

⑫ Int.Cl.<sup>4</sup>

A 61 K 37/02  
35/16

識別記号

ACS  
ACS

庁内整理番号

8615-4C

⑬ 公開 昭和63年(1988)1月30日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全8頁)

⑭ 発明の名称 肝細胞増殖因子

⑮ 特 願 昭61-166495

⑯ 出 願 昭61(1986)7月14日

⑰ 発 明 者	合 田	栄 一	鹿児島県鹿児島市錦江台1丁目51-2-31
⑱ 発 明 者	坪 内	博 仁	鹿児島県鹿児島市原良町1925
⑲ 発 明 者	中 山	宏 幸	鹿児島県鹿児島市郡元町880-5 唐湊スカイコーポ807号
⑳ 発 明 者	弘 野	修 一	鹿児島県鹿児島市田上台3丁目30-8 杉山マンション302
㉑ 出 願 人	橋 本	修 治	鹿児島県鹿児島市紫原6丁目49番3号
㉒ 出 願 人	大 工	原 恭	鹿児島県鹿児島市明和4丁目14番10-41
㉓ 出 願 人	合 田	栄 一	鹿児島県鹿児島市錦江台1丁目51-2-31
㉔ 出 願 人	坪 内	博 仁	鹿児島県鹿児島市原良町1925
㉕ 代 理 人	弁理士	長谷川 一	外1名

最終頁に続く

#### 明 細 書

発明の名称 肝細胞増殖因子

特許請求の範囲

① ヒト血液に由来し、以下の理化学的性質及び

生理活性を有する蛋白性物質であることを特徴とする肝細胞増殖因子。

1) SDS-PAGE (非還元条件下) による推定分子量が約76000~92000である、

2) 肝細胞を増殖させる活性を有する、

3) 80℃、10分間の加熱処理により上記活性が失活する、

4) トリプシン消化及びキモトリプシン消化により上記活性が失活する、及び

5) ヘパリンに強い親和性を有する。

発明の詳細な説明

#### 産業上の利用分野

本発明は、肝細胞増殖因子 (hepatocyte

growth factor: HGF)、詳しくはヒト血液に由来し、肝細胞の増殖を可能とする新しい蛋白性物質に関する。

#### 従 来 の 技 術

肝臓は、生体内中間代謝の中心的役割を果たす高度に分化の高度な臓器であり、その機能は肝臓を構成する肝実質細胞が担っている。しかし、例えばラットの肝臓はそのほぼ2/3を切除しても、残された組織が急速に増殖を開始し、約10日後には元の大きさに戻ることが知られ、この事実を利用して、ヒトでも肝臓患者等において肝臓の部分切除手術後、残された正常肝臓からの増殖を持つ移植が行なわれている。

上記肝臓の増殖 (肝再生) 機構につき、従来より各種の研究が行なわれ、肝切除後のラットの血液中に何らかの増殖促進因子が出現することが示唆され、該因子 (rat hepatocyte growth factor: rHGF) の部分精製に成功した例も種々報告さ

れている。しかしながら報告された各 hHGF はその分子重や物理化学的性質の面で必ずしも一致せず、いまだ不明な点が多く、またこれまでにヒトの血液中に両様の肝細胞増殖因子が存在することを示した報告はなかった。

本発明者らも、以前より上記肝細胞増殖促進因子につき、鋭意研究を重ねてきたが、その過程で慢性肝炎患者の血清が高い肝細胞増殖活性を有することを初めて見出した (Biomed. Res., 6, 231 (1985))。

#### 発明が解決しようとする問題点

本発明の目的は、上記本発明者らの研究に係わる慢性肝炎患者血清中に存在する新しい肝細胞増殖因子を分離精製して、その性質や臨床的応用のための知見を得ることにある。

#### 問題点を解決するための手段

本発明によれば、ヒト血液に由来し以下の理化学的性質及び生体活性を有する蛋白質物質である

各種動物由来の肝細胞を、該 hHGF の存在下に生体外で極めて容易に増殖、維持することができ、かくして増殖、維持される肝細胞は、例えば肝臓癌等の基礎的研究用、各種ホルモンもしくは薬剤等の肝細胞に対する作用の研究用、肝疾患治療薬等のスクリーニング試験用等に有用であり、更に発癌試験用及び肝炎ウイルスの生体外培養における宿主細胞としても有用である。本発明はかかる有用な生体活性物質を提供するものである。

以下、本発明の hHGF の製造方法につき詳述する。

本発明 hHGF は、ヒト血液、殊に慢性肝炎患者の血液より効率よく、しかも高収率で取ることができる。ここで原料として用いられる血液は、常法に従って得ることができ、通常は血清もしくは血漿として有利に使用し得る。尚、慢性肝炎患者の血液としては、血漿交換療法に順して得られる患者血漿が好適である。

ことを特徴とする肝細胞増殖因子 (human hepatocyte growth factor: hHGF) が提供される。

- 1) SDS-PAGE (非還元条件下) による推定分子量が約 76000~92000 である、
- 2) 肝細胞を増殖させる活性を有する、
- 3) 80℃、10 分間の加熱処理により上記活性が失活する、
- 4) トリアシン消化及びキモトリプシン消化により上記活性が失活する、及び
- 5) ヘパリンに強い親和性を有する。

本発明 hHGF の上記特性及びその他の性状については、後記実施例において詳述する。

本発明の hHGF は急性肝炎、慢性肝炎、肝硬変、慢性肝炎等の肝疾患の治療乃至は肝切除術後の治療薬として、また上記各疾患の免疫学的診断を確立するための抗原等として有用である。更に該 hHGF の利用によれば、ヒトをはじめとして

上記原料からの本発明 hHGF の製造は、基本的にはこの種の生体物質からの蛋白質物質の分離に用いられる通常の方法と同様にして、目的とする hHGF の物理的、化学的性質を利用した各種処理操作に従い実施することができる。該処理操作としては、例えば通常の蛋白沈殿剤による処理、膜外濾過、分子ふるいクロマトグラフィー (ゲル濾過)、遠心分離、電気泳動、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティークロマトグラフィー、逆相クロマトグラフィー、吸着クロマトグラフィー、透析法、これらの組み合わせ等が挙げられる。

特に好ましい上記操作の一例としては、まず原料、例えば血漿を 56℃ 程度で約 15 分間加熱後、滅菌分画することにより、滅菌濃度約 1、1~2、1 M の沈殿成分に活性物として収取することができる。上記活性物は更に例えば通常の担体を使用するゲル濾過、DEAE 等の陰イオン交換体

を使用するイオン交換クロマトグラフィー等により、精製することができる。殊に本発明者らの研究によれば、本発明のh HGFは、アフィニティブルー(Affi-Gel Blue、バイオ・ラッド ラボラトリーズ社)、ヘパリン及びヒドロキシアパタイトに強い結合性を有することが確認されており、之等のクロマトグラフィーによる精製が最適である。

上記各処理の操作、条件等は、通常のこの種の方法におけるそれらと同様のものとして行うことができる。

上記方法により本発明 h HGFが、単離精製され、これは上記した特性にて特定される。

尚、本発明 h HGFは、SDS処理によっても活性(肝臓癌増殖活性)が保持されることが確認されており、従って上記精製手段として、SDS PAGE(ドデシル硫酸ナトリウム-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法)をも好適に採用する

937~946(1978))。培養培地としては5%牛胎児血清(FCS、Filtron, Altona, Australia)、1  $\mu$ Mデキサメサゾン、100 U/ mlペニシリン及び100  $\mu$ g/ mlストレプトマイシンを添加したウィリアムスE培地(フローラボラトリーズ社、以下「基本培地」と略す)を使用した。培養開始後、4及び20時間目に被検試料を含む基本培地に培地交換し、40時間目に基本培地のみに交換した後、DNA合成を測定した。

DNA合成は、 $^3$ H-チミン(Amersham社)を4  $\mu$  Ci/ ml(2 Ci/ 100  $\mu$  l)添加した後、2時間37℃で培養を続け、DNAへの取り込みを測定することにより行なった。尚、上記 $^3$ H-チミンによるラベルに際し、10  $\mu$ Mヒドロキシウレアを添加した群をコントロール群とした。上記培養によるラベル後、細胞を冷PBS、2%過塩素酸及び95%エタノールで3回洗浄した。次いで細胞を風乾し、2  $\mu$ M EDTA及び20

ことができる。

#### 実 施 例

以下に実施例を示し、本発明をより具体的に述べるが、本発明はこれらに限定されるものではない。

##### 実施例1

##### (1) 肝臓癌増殖活性(HGF活性)の測定

セグレン(Seglen)の方法(Methods in cell biology, vol 13, p 29, Academic Press, New York (1976))に従い、ウィスター系雄ラット(体重200g)より、0.05%コラーゲナーゼ(タイプI、シグマ社)を用いて肝実質細胞を単離した。この肝実質細胞を直径1.55 cmのウェルを有するマルチウェル プラスチック ディッシュ(Nunc)に5  $\times$  10<sup>4</sup> 個/0.2 ml/cm<sup>2</sup>の密度でまき込み、5%炭酸ガス含有空気気相下、37℃で単離培養した(Tanaka et al., J. Biochem. 84,

8M NaHCO<sub>3</sub>を含有する2%SDSの0.8 mlで可溶化し、その一部をとって放射能測定及び蛋白質測定に供した。蛋白質の測定は、BSAを標準としてローリー法に従った。放射能測定により、被検試料により肝実質細胞DNAに取込まれた $^3$ H-チミン量を、コントロールとのカウントの差として求め、これを肝実質細胞1  $\mu$ g蛋白質当り、1時間当りに換算してDNA合成活性(dpm/hr/ $\mu$ g 蛋白)とし、被検試料のHGF活性の指標とした。

##### (2) 本発明 h HGFの製造

① 劇症肝炎患者の血液交換療法に際して得られた患者血液を原料として用いた。

まず原料血液930 mlを、56℃で15分間加熱し、4℃で60分間遠心分離(105000g)した。以下の精製操作は全て4℃で行なった。

次いで、上清液を同量の蒸留水で希釈し、これに3.8 M硫酸アンモニウム(pH 6.0)を添

加して分画した。1.15M~2.05M硫酸アンモニウム沈降分画を、PBS(-)の少量に溶かし、同量透析液に対して透析した。

透析液をPBS(-)で平衡化したアフィゲルブルーのカラム(3.9×11cm)にかけ、PBS(-)250ml及び1.4M NaClを含むPBS(-)(pH7.4)250mlで順次洗浄した。次いで活性画分を2Mグリシン硫酸(pH7.4)350mlで溶出させ、溶出液をPBS(-)に対して72時間(少なくとも5回)緩交換を行なう)透析した。

透析液に、トリトンX-100(Triton X-100)を最終濃度が0.013%となるように添加し、これを0.013%トリトンX-100を含むPBS(-)で平衡化したヘパリンセファロースカラム(ファルマシア社、1.6×5cm)にかけた。カラムを0.1Mリン酸ナトリウムpH7.120mlで洗浄後、室温で、0.1Mから0.5Mリン酸ナトリウムのリニアグラデーションにより溶出(2mlフラクション)させた。

0.5Mから1.75M NaClのリニアグラデーションにより溶出させた。

上記で得られた活性画分(0.84~1.15M NaCl)を、0.013%トリトンX-100を含むPBS(-)で2倍希釈した後、同PBS(-)で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム(バイオ・ラドラボラトリーズ社、1.6×5cm、流速20ml/hr)にかけた。カラムを同バッファー20mlで洗浄し、次いで0.15M NaCl及び0.013%トリトンX-100を含有する0.1Mリン酸ナトリウムバッファー(pH7.1)20mlで洗浄後、室温で、0.1Mから0.5Mリン酸ナトリウムのリニアグラデーションにより溶出(2mlフラクション)させた。

上記溶出パターンを第1図に示す。図において横軸はフラクションNo.を、縦軸はHGF活性(曲線(1)で示される)及びリン酸ナトリウム濃度(曲線(2)で示される)をそれぞれ示す。

活性の最も高い画分(フラクションNo.60~66)を集め、-20℃で保存した。

かくして、原料画分から、20万倍以上に精製されたh HGFを得た。

該h HGFのHGF活性は、加熱処理(80℃、10分間)及び酵素処理(0.1mg/mlトリプシン、37℃、30分間及び0.1mg/mlキモトリプシン、37℃、30分間)により失活した。また0.5M酢酸、0.1M酢酸緩衝液(pH4.0)、同(pH5.0)、0.1Mリン酸緩衝液(pH7.4)及び0.1Mグリシン緩衝液(pH9.5)のいずれの処理(4℃、20時間)によっても安定であった。

## ② SDS-PAGE

レムリ(Lacall)の方法(Nature, 227, 680-685(1970))に従い、3%スタッキングゲル及び8%分離ゲル(厚さ1mm)を用いて、室温下にSDS-PAGEを行なった。

即ち、上記①で得たh HGFを、セントリコン10(アミコン社)を用いて約10倍に濃縮し、この濃縮h HGFを、サンプルバッファーの2倍濃縮液(6%SDS、20%グリセロール及び0.025%プロモフェノールブルーを含む125mMトリス・塩酸緩衝液(pH6.8)からなる)の等量と混合した後、25℃で1時間処理してサンプルとした。電気泳動後、分離ゲルの3レーンを剃刀の刃で1.5mmにスライスした。切片を試験管に入れ、細かく切り、煮沸下、室温で20時間を要して、0.013%トリトンX-100及び0.02%SDSを含むPBS(-)1mlで抽出し、HGF活性の測定に供した。他の1レーンは、10%三酸化酢酸で固定後、固染色を行ない、分子重量スタンダード(ファルマシア社)から、推定分子量を算出した。

上記結果を第2図に示す。図において横軸はスライスNo.を、縦軸はHGF活性を示す。

上記SDS-PAGEによれば、非還元条件下で、本発明hHGFは、分子量約76000～92000にわたるバンドとして泳動され、該バンド(スライスNo.29～34)に一致したHGF活性が確認された。

③ 上記②において、ゲルスライスから抽出されたhHGFにつき、再度、上記②と同様にしてSDS-PAGEを行なった。

その結果を第3図に示す。図において横軸はレーンNo.を示し、レーン1は上記②におけるスライスNo.29を、レーン2は同スライスNo.30を、レーン3は同スライスNo.31を、レーン4は同スライスNo.32を、レーン5は同スライスNo.33を、レーン6は同スライスNo.34をそれぞれ示す。また縦軸は分子量スタンダードから求めた分子量( $\times 10^{-6}$ )を示す。

上記結果によれば、hHGFには、わずかに分子量の異なるいくつかの分子型が存在し、それら

は上記方法により分離することができた。分離されたそれぞれの分子量を、それらのHGF活性と共に、下記第1表に示す。尚、HGF活性は染色強度に応じた値が附られた。

第 1 表

レーン No.	分 子 量 (非還元条件)	HGF 活性 (dpm / hr / $\mu$ g 蛋白)
1	約92000	17.3
2	約88000	38.6
3	約86000	93.9
4	約83000と 約81000	31.2
5	約79000	70.5
6	約79000と 約76000	10.5

尚、上記において、還元条件下でのSDS-PAGEによれば、いずれも分子量56000～

65000及び32000～35000の両グループにメインバンドを与えた。このことより、hHGFはこれらがスルフィド結合により結合した蛋白質物質であり、上記7種の分子型はいずれも実質的にhHGFとして同一であると推定された。

#### ④ 用量依存効果

上記②で得られたhHGFを用いて、HGF活性の用量依存性を調べた。

結果を第4図に示す。图中、横軸はhHGFの濃度( $\text{ng}/\text{ml}$ )を、縦軸はHGF活性( $\text{dpm}/\text{hr}/\mu\text{g}$  蛋白)を示す。また図において「hEGF」はマウス上皮生長因子(和光純薬社)の25 $\text{ng}/\text{ml}$ を用いた結果を示す。

⑤ 上記④で得たhHGF、インスリン、マウス上皮生長因子(hEGF、和光純薬社)及びヒト上皮生長因子(hEGF、興永製薬社)の組合せによる、肝細胞増殖効果を確認試験した。

結果を下記第2表に示す。

表中、ラベリング インデックスは、オートラジオグラフィ(Blomed Res. 6, 231 (1985))に従って、 $^3\text{H}$ -チミンでラベルされた細胞の計測によって算出されたものであり、少なくとも250個以上の細胞の測定による百分率で示される。該インデックスは、肝実質細胞の増殖を反映する指標である。また、表中HGF活性及びラベリング インデックスの結果は、それぞれ平均値 $\pm$ SD(3回試験の場合、2回試験の場合は、平均値)で示される。

第 2 表

試 料	濃 度 (ng/ml)	HGF活性 (dpm/h/ μg 蛋白)	ラベリング インデックス (%)
無 添 加	-	1.7 ± 0.4	< 0.2
インスリン	600	7.8 ± 0.8	4.1
hEGF	2.1 6.3 8.4	42.7 ± 3.3 175.4 ± 3.3 197.9 ± 3.1	9.2 24.7 ± 7.7 31.7 ± 3.4
hHGF	8.3	297.9 ± 19.4	50.1 ± 1.2
hHGF + hEGF	8.3 + 6.3 8.3 + 8.4	578.9 ± 47.2 569.1 ± 3.2	66.8 64.0
インスリン + hEGF	600 + 50	461.8 ± 35.3	-
インスリン + hEGF	600 + 6.3	503.9 ± 8.5	63.1 ± 5.8
インスリン + hHGF	600 + 8.3	461.5 ± 21.6	77.9 ± 5.3
インスリン + hHGF + hEGF	600 + 8.3 + 6.3	684.0 ± 41.0	85.0 ± 4.0

第2表より、h HGFの肝臓細胞増殖活性は、インスリン、hEGF及びhEGFのそれらよりも強く、しかもそれらと相加的或いは相乗的であることが判る。

尚、h HGFの肝臓細胞増殖活性は、位相性細胞増殖下における、肝実質細胞の核分裂数の観察及びウェル内の総核数の増加によっても観察された。図面の簡単な説明

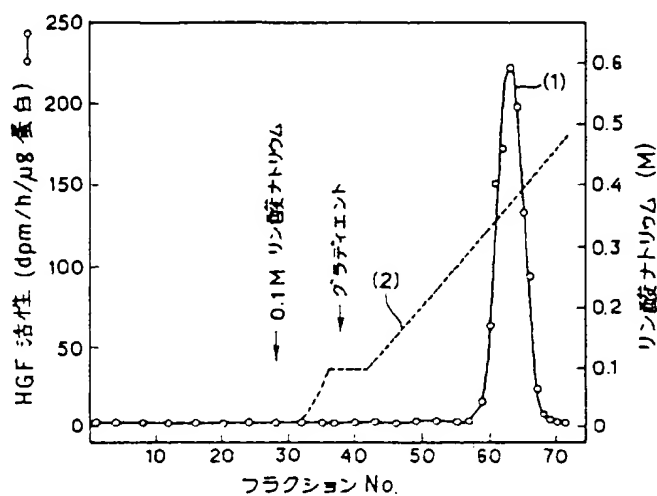
第1図は本発明h HGFのヒドロキシアパタイトカラムからの溶出を示すグラフである。第2図及び第3図は、それぞれ本発明h HGFのSDS-PAGEによる分析結果を示すものである。第4図は本発明h HGFの用量依存曲線を示すものである。

(以 上)

代理人 弁護士 三 枝 英 二

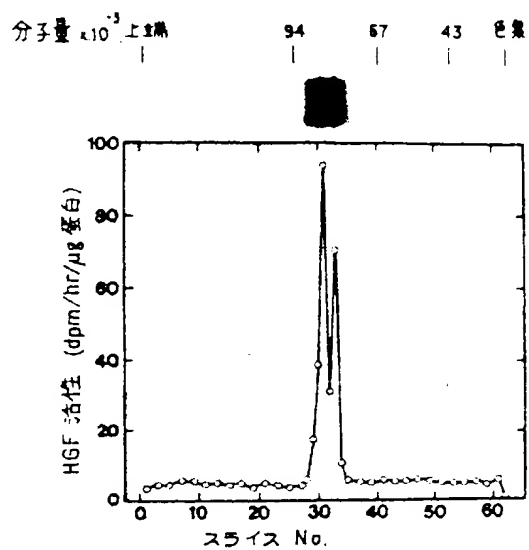


第 1 図



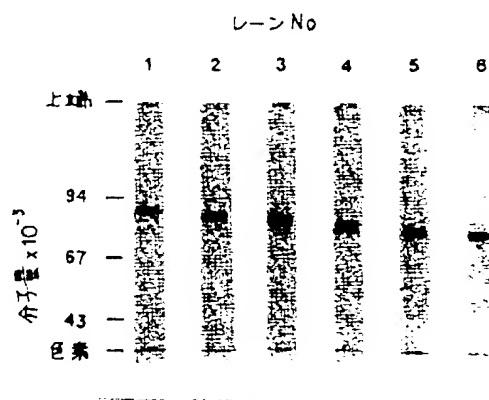
図面の枠内(内容に変更なし)

第 2 図

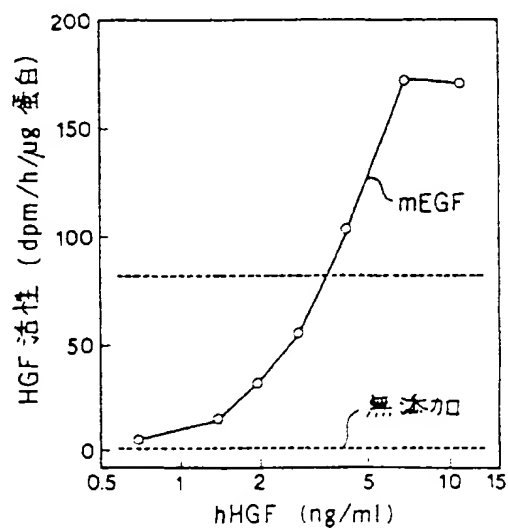


図面の枠内(内容に変更なし)

第 3 図



第 4 図



第1頁の続き

⑬発明者	高橋	耕三	鹿児島県鹿児島市松原町6-2 松原ハイッ307号
⑭発明者	橋本	修治	鹿児島県鹿児島市紫原6丁目49番3号
⑮発明者	大工原	恭	鹿児島県鹿児島市明和4丁目14番10-41

手続補正書(方式)

昭和61年10月27日

補正の内容

1 第2図及び第3図を別紙の通り訂正します。

(以上)

特許庁長官 黒田明雄 殿



- 1 事件の表示  
昭和61年特許願第166495号
- 2 発明の名称  
肝細胞増殖因子
- 3 補正をする者  
事件との関係 特許出願人  
橋本修治(ほか3名)
- 4 代理人  
大阪市東区平野町2の10 沢のビル  
(6521) 弁理士 三枝英二
- 5 補正命令の日付  
昭和61年9月30日
- 6 補正の対象  
図面(第2図及び第3図)
- 7 補正の内容  
別紙添附の通り